

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 1 167 520 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
02.01.2002 Patentblatt 2002/01

(51) Int Cl.7: C12N 9/12, C12N 9/10,
C12N 9/00, C12N 9/88,
C12N 15/54, C12N 15/60,
C12N 15/52, C12P 7/42
// C12R1:15

(21) Anmeldenummer: 01114629.7

(22) Anmeldetag: 19.06.2001

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR

Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 23.06.2000 DE 10030702

(71) Anmelder: Degussa AG
40474 Düsseldorf (DE)

(72) Erfinder:

- Dusch, Nicole, Dr.
33824 Werther (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)

(54) **Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäsäure unter Verwendung coryneformer Bakterien**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothenäsäure durch Fermentation coryneformer Bakterien, bei dem man Bakterien einsetzt, in denen man die für die Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodierende Nucleotidsequenz (pfkA-Gen) verstärkt, insbesondere überexprimiert, wobei man folgende Schritte ausführt:

a) Fermentation der D-Pantothenäsäure produzierenden Bakterien, in denen zumindest das für

Phosphofructokinase kodierende Gen verstärkt wird,

b) Anreicherung der D-Pantothenäsäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und

c) Isolieren der produzierten D-Pantothenäsäure.

EP 1 167 520 A2

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung coryneform Bakterien, in denen das pfkA-Gen verstärkt ist.

Stand der Technik

[0002] Die Pantothenäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.

[0003] Pantothenäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Zwischenstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt, D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert und so die gewünschte D-Pantothenäure erhalten.

[0004] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren D-Form, die frei von L-Pantothenäure ist.

[0005] Verschiedene Arten von Bakterien, wie zum Beispiel *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie zum Beispiel *Debaromyces castellii* können wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothenäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, dass bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothenäure-Biosynthesegenen aus E.coli, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantothenäure verbessert wird.

[0006] EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 beschreiben von *Escherichia coli* Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten, wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069, die Resistenzen gegen verschiedene Antimtabolite wie Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin und α -Ketoisovaleriansäure tragen. Sie produzieren in einer Nährlösung, die Glucose enthält, Pantolacton, und in einer Glucose- und β -Alanin-haltigen Nährlösung D-Pantothenäure. In EP-A 0 590'857 und US-Patent 5,518,906 wird weiterhin gezeigt, dass nach Amplifikation der Pantothenäure-Biosynthesegene, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den b n genannten Stämmen in glucose-haltigen Nährösungen, die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährlösung, die Glucose und β -Alanin enthält, die Produktion von D-Pantothenäure verbessert wird.

[0007] Verfahren zur Herstellung von D-Pantothenäure mit Hilfe von *Corynebacterium glutamicum* sind in der Literatur nur ansatzweise bekannt. So berichten Sähm und Eggeling (Applied and Environmental Microbiology 65(5), 1973-1979 (1999)) über den Einfluss der Überexpression der Gene panB und panC und Dusch et al. (Applied and Environmental Microbiology 65(4), 1530-1539 (1999)) über den Einfluß des Gens panD auf die Bildung der D-Pantothenäure.

Aufgabe der Erfindung

[0008] Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pantothenäure mit coryneformen Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

[0009] Das Vitamin Pantothenäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht ein allgemeines Interesse daran, verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure bereitzustellen.

[0010] Wenn im Folgenden D-Pantothenäure oder Pantothenäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freien Säuren, sondern auch die Salze der D-Pantothenäure, wie zum Beispiel das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

[0011] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen die für das Enzym Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodierende Nucleotidsequenz (pfkA-Gen) verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.

[0012] Die eingesetzten Stämme produzieren bevorzugt bereits vor der Verstärkung des pfkA-Gens D-Pantothenäure.

[0013] Bevorzugte Ausführungsformen finden sich in den Ansprüchen.

[0014] Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen

verwendet, das für in entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegen ebenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0015] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können D-Pantothenäure aus Glu-

5 cose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter coryneformer Bakterien, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

[0016] Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind beispielsweise die bekannten Wildtypstämme

- 10 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
15 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte, D-Pantothenäure produzierende Mutanten wie beispielsweise

- 20 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032ΔilvA/pEC7panBC
Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-D2

[0017] Es wurde gefunden, dass coryneforme Bakterien nach Überexpression des für die Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodierenden pfkA-Gens in verbesserter Weise Pantothenäure produzieren.

[0018] Die Nukleotidsequenz des pfkA-Gens ist in der SEQ ID No 1 und die sich daraus ergebende Aminosäuresequenz des Enzymproteins in SEQ ID No 2 dargestellt.

[0019] Das in der SEQ ID No 1 beschriebene pfkA-Gen kann erfahrungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele des pfkA-Gens verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen (sense mutations) ergeben.

[0020] Zur Erzielung einer Verstärkung (zum Beispiel Überexpression) erhöht man zum Beispiel die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Pantothenäure-Bildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

[0021] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekulärbiologie.

[0022] Beispieldhaft wurde das pfkA-Gen mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert.

[0023] Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie zum Beispiel pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEEx1 (Eikmaäns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie zum Beispiel solche, die auf PCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

[0024] Weiterhin eignen sich solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert; der in einem Wirt (typischerweise *E.*

(*coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., *Bio/Technology* 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., *Gene* 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). *Journal of Biological Chemistry* 269:32678-84; US-A 5,487,993); pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., *Journal of Molecular Biology*, 234:

5 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, *Journal of Bacteriology* 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielweise bei Thierbach et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 29, 356-362 (1988)), Duncan und Shivnan (*Bio/Technology* 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (*FEMS Microbiological Letters* 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

10 [0025] Beispielhaft wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom eingesetzt. Hierzu wurde der in der Abbildung 1 dargestellte Plasmidvektor pT-pfkAexp verwendet.

15 [0026] Zusätzlich kann es für die Produktion von Pantotheninsäure vorteilhaft sein, neben dem für die Phosphofructokinase kodierendem Gen ein oder mehrere weitere für Enzyme des Pantotheninsäure-Biosyntheseweges oder des Keto-Isovaleriansäure-Biosyntheseweges codierende Gene wie zum Beispiel

- 20 • das für die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase kodierende panB-Gen (Sahm et al., *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1973-1979 (1999)) oder
- 25 • das für die Pantothenat-Synthetase kodierende panC-Gen (Sahm et al., *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1973-1979 (1999)) oder
- das für die Dihydroxysäure-Dehydratase kodierende ilvD-Gen

zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

[0027] Weiterhin kann es für die Produktion von Pantotheninsäure vorteilhaft sein, neben der Überexpression der Phosphofructokinase unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.); Academic Press, London, UK, 1982).

[0028] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantotheninsäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (*Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (*Bioreaktoren und periphere Einrichtungen* (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0029] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate, wie zum Beispiel Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe, wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantotheninsäure-Produktion Vorstufen der Pantotheninsäure, wie Aspartat, β-Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoinsäure oder Pantoinsäure, und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüllt werden.

[0030] Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak

oder saure Verbindungen wie Phosphorsäur oder Schw felsäure in g eigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, zum Beispiel Antibiotika, hinzug fügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoffhal-

5 tige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothenensäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0031] Die Konzentration an gebildeter Pantothenensäure kann mit bekannten chemischen (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) oder mikrobiologischen Verfahren wie zum Beispiel dem Lactobacillus plantarum Test (DIFCO MANUAL, 10th Edition, S. 1100-1102; Michigan, USA) bestimmt werden.

[0032] Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:
Corynebacterium glutamicum DSM5715/pT-pfkAexp als DSM13253

15 Beispiele

[0033] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

[0034] Zu diesem Zweck wurden Versuche mit dem Isoleucinbedürftigen Stamm ATCC13032ΔilvA und dem Plasmid pND-D2 durchgeführt. Der Stamm ATCC13032ΔilvA ist als DSM12455 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt worden. Das pND-D2 Plasmid ist bei Dusch et al. (Applied and Environmental Microbiology 65(4), 1530-1539 (1999)) beschrieben und in Form des Stammes Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-D2 als DSM12438 ebenfalls bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt.

25

Beispiel 1

[0035] Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

[0036] Chromosomal DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI; Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC 13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

50

Beispiel 2

[0037] Isolierung und Sequenzierung des pfkA-Gens

[0038] Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Gron-

ingen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenzervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 µg/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

[0039] Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

[0040] Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1029 Basenpaaren, welches als pfkA-Gen bezeichnet wurde. Das pfkA-Gen kodiert für ein Protein von 343 Aminosäuren dargestellt in SEQ ID NO 2.

Beispiel 13

[0041] Herstellung eines Plasmides zur Expression von pfkA in *Corynebacterium glutamicum*

3.1. Klonierung von pfkA im Vektor pCR-Blunt2

[0042] Chromosomal DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179). Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des pfkA-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt:

pfkA-exp

5'-AAC TGC AGC TCT GGC GAT TA-3'

pfk-ex2

5'-AAC TAT CCA AAC ATT GCC TG-3'

[0043] Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein ca. 1160 bp großes DNA-Fragment isoliert, welches das pfkA-Gen trägt.

[0044] Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K2800-20) in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO Vektor (Shuman et al., (1994) Journal of Biological Chemistry. 269:32678-32684; Bernard et al., (1983) Journal of Molecular Biology. 234: 534-541) ligiert. Anschließend wurde der *E. coli* Stamm Top10 (Grant et al. (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 87:4645-4649) mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCRB1-pfkAexp1 genannt.

3.2. Herstellung des Shuttle Vektors pEC-T18mob2

[0045] Nach dem Stand der Technik wurde der *E. coli* - *C. glutamicum* Shuttle-Vektor konstruiert. Der Vektor enthält die Replikationsregion rep des Plasmids pGA1 einschließlich des Replikationseffectors per (US-A-5,175,108; Nesvra

et al., Journal of Bacteriology 179, 1525-1532 (1997)), das Tetracyclinresistenz vermittelnde tetA(Z)-Gen des Plasmids pAG1 (US-A- 5,158,891; Genbank-Eintrag beim National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA) mit der accession number AF121000), die Replikationsregion oriV des Plasmids pMB1 (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 43, 77-90 (1979)), das lacZα Genfragment einschließlich des lac-Promotors und einer Mehrfachklonierschnittstelle (multiple cloning site, mcs) (Norrander et al. Gene 26, 101-106 (1983)) und die mob-Region des Plasmids RP4 (Simon et al., (1983) Bio/Technology 1:784-791). Der konstruierte Vektor wurde in den E. coli Stamm DH5α (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 5 mg/l Tetracyclin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und HindIII anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pEC-T18mob2 genannt und ist in Figur 2 dargestellt.

15 3.3. Klonierung von pfkA im Shuttle-Vektor pEC-T18mob2

[0046] Als Vektor wurde der in Beispiel 3.2 beschriebene E. coli - C. glutamicum Shuttle-Vektor pEC-T18mob2 verwendet. DNA dieses Plasmids wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert.

[0047] Aus dem in Beispiel 3.1. beschriebenen Plasmid pCRB1-pfkAexp1 wurde das pfkA-Gen durch vollständige Spaltung mit dem Enzym EcoRI isoliert. Das ca 1160bp große pfkA Fragment wurde aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

[0048] Das auf diese Weise gewonnene pfkA-Fragment wurde mit dem vorbereiteten Vektor pEC-T18mob2 gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5αmr (Grant et al., (1990). Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 87: 4645-4649) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 5 mg/l Tetracyclin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

[0049] Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten, um das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene Plasmid wurde pT-pfkAexp genannt. Es ist in Figur 1 dargestellt.

35 Beispiel 4

Herstellung des Stammes ATCC13032ΔilvA/pND-D2, pT-pfkAexp

[0049] Nach Elektroporation (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) des Plasmids pND-D2 in den C. glutamicum Stamm ATCC13032ΔilvA und anschließender Selektion auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1: 190-206), der mit 25 µg/ml Kanamycin supplementiert worden war, wurde der Stamm ATCC13032ΔilvA/pND-D2 erhalten.

[0050] Nach Elektroporation des Plasmids pT-pfkAexp (Beispiel 3) in den C. glutamicum Stamm ATCC13032ΔilvA/pND-D2 und anschließender Selektion auf LB-Agar, der mit 25 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Tetracyclin supplementiert worden war, wurde der Stamm ATCC13032ΔilvA/pND-D2, pT-pfkAexp erhalten.

Beispiel 5

Herstellung von Pantothenäsäure

[0051] Die Bildung von Pantothenat durch die C. glutamicum Stämme ATCC13032ΔilvA/pND-D2 und ATCC13032ΔilvA/pND-D2, pT-pfkAexp wurde in Medium CGXII (Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175: 5595-5603; Tabelle 1) geprüft, das mit 25 µg/ml Kanamycin, 2 mM Isoleucin und im Falle des Stammes ATCC13032ΔilvA/pND-D2, pT-pfkAexp mit zusätzlich 10 µg/ml Tetracyclin supplementiert worden war.

[0052] Dieses Medium wird im Folgenden als C. glutamicum-Testmedium bezeichnet. Je 50 ml frisch angesetztes C. glutamicum-Testmedium wurden aus einer 16 Stunden alten Vorkultur des gleichen Mediums dergestalt angeimpft, dass die optische Dichte der Kultursuspension (D_{590}) bei Inkubationsbeginn 0,1 betrug. Die Kulturen wurden bei 30°C und 130 U/min bebrütet. Nach 5 stündiger Inkubation wurde IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactosid) in einer End-

konzentration von 1 mM hinzugefügt. Nach 48stündiger Inkubation wurde die optische Dichte (oD_{580}) der Kultur bestimmt und anschließend die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 g entfernt und der Überstand sterilfiltriert.
 [0053] Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde ein Novaspec II Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 580 nm eingesetzt.

[0054] Die Quantifizierung des D-Pantothenats im Kulturüberstand erfolgte mittels Lactobacillus plantarum ATCC 8014 nach Angaben des Handbuchs der Firma DIFCO (DIFCO MANUAL, 10th Edition, S. 1100-1102; Michigan, USA). Für die Kalibrierung wurde das Hemicalciumsalz von Pantothenat der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

[0055] Das Ergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1

Substanz	Menge pro Liter	Bemerkung
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	20 g	
Harnstoff	5 g	
KH_2PO_4	1 g	
K_2HPO_4	1 g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.25 g	
MOPS	42 g	
CaCl_2	10 mg	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg	
CuSO_4	0.2 mg	
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.02 mg	
Biotin	0.5 mg	
Glukose	40 g	separat autoklavieren
Protocatechusäure	0.03 mg	sterilfiltrieren

Tabelle 2

Stamm	Zelldichte oD_{580}	Konzentration (ng/ml)
ATCC13032ΔilvA/pND-D2	11,5	47,9
ATCC13032ΔilvA/pND-D2, pT-pfkAexp	12,8	119,9

Folgende Abbildungen sind beigefügt:

[0056]

Figur 1: Karte des Plasmids pT-pfkAexp
 Figur 2: Karte des Plasmids pEC-T18mob2

[0057] Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

Tet:	Resistenzgen für Tetracyclin
oriV:	Plasmidkodierter Replikationsursprung von E. coli
RP4mob:	mob Region zur Mobilisierung des Plasmides
rep:	Plasmidk. diert r Replikationsursprung aus C. glutamicum Plasmid pGA1
per:	G n zur Kontroll der Kopi nzahl aus pGA1
lacZ-alpha:	lacZα-Genfragment (N-Terminus) d s β-Galactosidas Gens

'lacZalpha': 3'Ende des lacZ α -Genfragments
lacZ-alpha': 5'Ende des lacZ α -Genfragments
pfkA: pfkA-Gen aus C. glutamicum ATCC13032

5 BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms BamHI
EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
HindIII: Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII
KpnI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms KpnI
PstI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI
10 Pvul: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Pvul
Sall: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Sall
SacI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms SacI
SmaI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms SmaI
SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms SphI
15 XbaI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms XbaI
Xhol: Schnittstelle des Restriktionsenzyms XhoI

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure
unter Verwendung coryneformer Bakterien

<130> 000213 BT

10 <140>

<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1274

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (143)..(1171)

25 <400> 1

gtcgatttgt taatgaaaact gcagctctgg cgattaaata agatggtcag agacagttt 60

ttggcctgtc aaccctgtg attctttat ttttggtga ttgttccgc ggggtgttg 120

30 tgatgggtt aatatggaag ac atg cga att gct act ctc acg tca ggc ggc 172
Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly
1 5 1035 gac tgc ccc gga cta aac gcc gtc atc cga gga atc gtc cgc aca gcc 220
Asp Cys Pro Gly Leu Asn Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala
15 20 2540 agc aat gaa ttt ggc tcc acc gtc gtt ggt tat caa gac ggt tgg gaa 268
Ser Asn Glu Phe Gly Ser Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu
30 35 4045 gga ctg tta ggc gat cgt cgc gta cag ctg tat gac gat gaa gat att 316
Gly Leu Leu Gly Asp Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile
45 50 5550 gac cga atc ctc ctt cga ggc ggc acc att ttg ggc act ggt cgc ctc 364
Asp Arg Ile Leu Leu Arg Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu
60 65 7055 cat ccg gac aag ttt aag gcc gga att gat cag att aag gcc aac tta 412
His Pro Asp Lys Phe Lys Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu
75 80 85 90gaa gac gcc ggc atc gat gcc ctt atc cca atc ggt ggc gaa gga acc 460
Glu Asp Ala Gly Ile Asp Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr
95 100 105

ctg aag ggt gcc aag tgg ctg tct gat aac ggt atc cct gtt gtc ggt 508
 Leu Lys Gly Ala Lys Trp Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly
 110 115 120

5 gtc cca aag acc att gac aat gac gtg aat ggc act gac ttc acc ttc 556
 Val Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe
 125 130 135

10 ggt ttc gat act gct gtg gca gtg gct acc gac gct gtt gac cgc ctg 604
 Gly Phe Asp Thr Ala Val Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu
 140 145 150

15 cac acc acc gct gaa tct cac aac cgt gtg atg atc gtg gag gtc atg 652
 His Thr Thr Ala Glu Ser His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met
 155 160 165 170

20 ggc cgc cac gtg ggt tgg att gct ctg cac gca ggt atg gcc ggc ggt 700
 Gly Arg His Val Gly Trp Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly
 175 180 185

gct cac tac acc gtt att cca gaa gta cct ttc gat att gca gag atc 748
 Ala His Tyr Thr Val Ile Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile
 190 195 200

25 tgc aag gcg atg gaa cgt cgc ttc cag atg ggc gag aag tac ggc att 796
 Cys Lys Ala Met Glu Arg Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile
 205 210 215

30 atc gtc gtt gcg gaa ggt gcg ttg cca cgc gaa ggc acc atg gag ctt 844
 Ile Val Val Ala Glu Gly Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu
 220 225 230

35 cgt gaa ggc cac att gac cag ttc ggt cac aag acc ttc acg gga att 892
 Arg Glu Gly His Ile Asp Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile
 235 240 245 250

gga cag cag atc gct gat gag atc cac gtg cgc ctc ggc cac gat gtt 940
 Gly Gln Gln Ile Ala Asp Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val
 255 260 265

40 cgt acg acc gtt ctt ggc cac att caa cgt ggt gga acc cca act gct 988
 Arg Thr Thr Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Thr Pro Thr Ala
 270 275 280

45 ttc gac cgt gtt ctg gcc act cgt tat ggt gtt cgt gca gct cgt gcg 1036
 Phe Asp Arg Val Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala
 285 290 295

50 tgc cat gag gga agc ttt gac aag gtt gct ttg aag ggt gag agc 1084
 Cys His Glu Gly Ser Phe Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser
 300 305 310

att gag atg atc acc ttt gaa gaa gca gtc gga acc ttg aag gaa gtt 1132
 Ile Glu Met Ile Thr Phe Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val
 315 320 325 330

cca ttc gaa cgc tgg gtt act gcc cag gca atg ttt gga tagttttcg 1181
 Pro Phe Glu Arg Trp Val Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
 335 340

5 ggctttatc aacagccaat aacagcttt tcgcccattt aggtggaggg gctgttttt 1241
 catccgtaa ggaaagtgc a agtaagtcaa atc 1274

10 <210> 2
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

15 <400> 2
 Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly Asp Cys Pro Gly Leu Asn
 1 5 10 15

20 Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala Ser Asn Glu Phe Gly Ser
 20 25 30

Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu Gly Leu Leu Gly Asp Arg
 35 40 45

25 Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Asp Arg Ile Leu Leu Arg
 50 55 60

Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu His Pro Asp Lys Phe Lys
 65 70 75 80

30 Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu Glu Asp Ala Gly Ile Asp
 85 90 95

Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr Leu Lys Gly Ala Lys Trp
 100 105 110

35 Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly Val Pro Lys Thr Ile Asp
 115 120 125

40 Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val
 130 135 140

Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu His Thr Thr Ala Glu Ser
 145 150 155 160

45 His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met Gly Arg His Val Gly Trp
 165 170 175

Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly Ala His Tyr Thr Val Ile
 180 185 190

50 Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile Cys Lys Ala Met Glu Arg
 195 200 205

Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile Ile Val Val Ala Glu Gly
 210 215 220

Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Glu Gly His Ile Asp
 225 230 235 240

5 Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile Gly Gln Gln Ile Ala Asp
 245 250 255

Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val Arg Thr Thr Val Leu Gly
 260 265 270

10 His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala Phe Asp Arg Val Leu Ala
 275 280 285

15 Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala Cys His Glu Gly Ser Phe
 290 295 300

Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser Ile Glu Met Ile Thr Phe
 305 310 315 320

20 Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val Pro Phe Glu Arg Trp Val
 325 330 335

Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
 340

25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothenäure durch Fermentation coryneformer Bakterien, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen man die für die Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodierende Nucleotidsequenz (pfkAn) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der D-Pantothenäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der D-Pantothenäure verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für die Phosphofructokinase kodierende Nucleotidsequenz trägt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man mit dem Plasmid pT-pfkAexp, hinterlegt unter der Nummer DSM 13253 bei der DSMZ, transformierte Bakterien einsetzt.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man gleichzeitig das für die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase kodierende panB-Gen verstärkt.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man gleichzeitig das für die Pantothenat-Synthetase kodierende panC-Gen verstärkt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man gleichzeitig das für die Dihydroxsäure-Dehydratase kodierende ilvD-Gen verstärkt.
9. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die genannten Gene in coryneformen Bakterien verstärkt, die bereits D-Pantothenäure produzieren.
10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der D-Pantothenensäur produzierenden Bakterien, in denen zumindest das für die Phosphofructokinase kodierende Gen verstärkt wird,
10 b) Anreicherung der D-Pantothenensäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
15 c) Isolieren der produzierten D-Pantothenensäure.

20 11. Coryneforme Bakterien, in denen man die für die Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodierenden Nucleotidsequenzen (pfkA-Gen) verstärkt, insbesondere überexprimiert.

25 12. *Corynebacterium glutamicum DSM5715/pT-pfkAexp* hinterlegt unter der Nummer DSM 13253 bei der DSMZ,
30 Braunschweig.

35

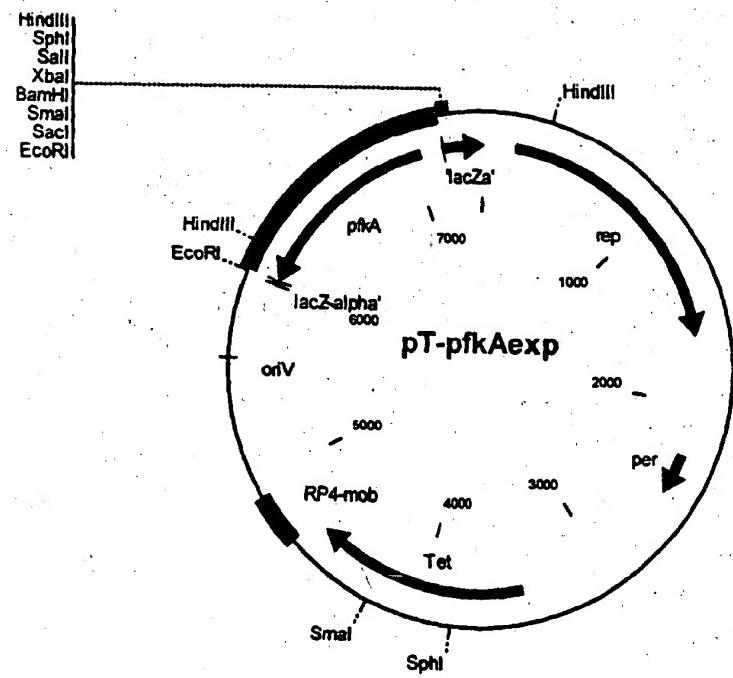
40

45

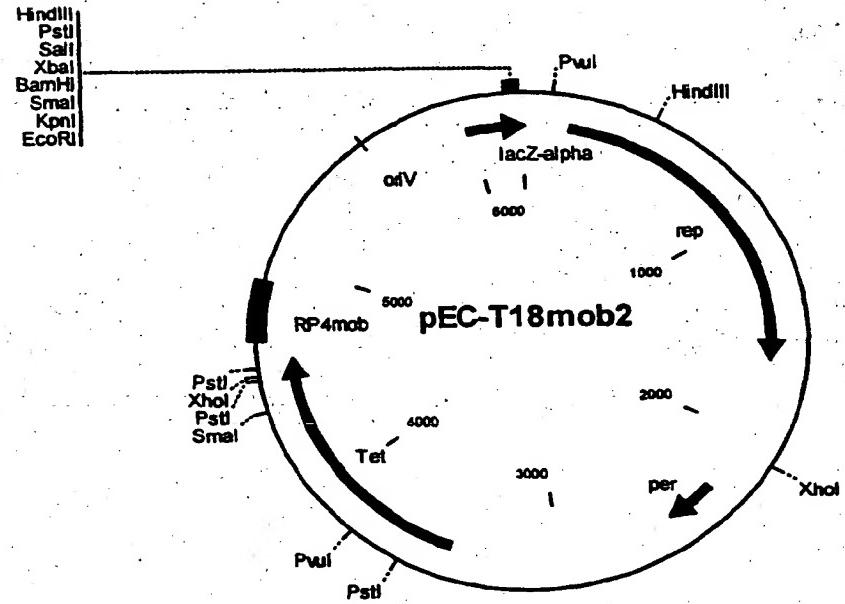
50

55

Figur 1: Plasmidkarte pT-pfkAexp



Figur 2: Plasmidkarte pEC-T18mob2



(19)



Europäisches Patentamt

Europäische Patent Office

Office européen des brevets

(11)



EP 1 167 520 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
23.01.2002 Patentblatt 2002/04

(51) Int Cl.7: C12N 9/12, C12N 9/10,
C12N 9/00, C12N 9/88,
C12N 15/54, C12N 15/60,
C12N 15/52, C12P 7/42
// C12R1:15

(21) Anmeldenummer: 01114629.7

(22) Anmeldetag: 19.06.2001

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI
(30) Priorität: 23.06.2000 DE 10030702

(71) Anmelder: Degussa AG
40474 Düsseldorf (DE)

(72) Erfinder:
• Dusch, Nicole, Dr.
33824 Werther (DE)
• Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)

(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäsäure unter Verwendung coryneformer Bakterien

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothenäsäure durch Fermentation coryneformer Bakterien, bei dem man Bakterien einsetzt, in denen man die für die Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodierende Nucleotidsequenz (pfkA-Gen) verstärkt, insbesondere überexprimiert, wobei man folgende Schritte ausführt:

a) Fermentation der D-Pantothenäsäure produzierenden Bakterien, in denen zumindest das für

Phosphofructokinase kodierende Gen verstärkt wird,

b) Anreicherung der D-Pantothenäsäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und

c) Isolieren der produzierten D-Pantothenäsäure.

EP 1 167 520 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 01 11 4629

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	EP 1 006 192 A (DEGUSSA) 7. Juni 2000 (2000-06-07) * Beispiel 5; Tabelle 5 *	1-10	C12N9/12 C12N9/10 C12N9/00 C12N9/88 C12N15/54 C12N15/60 C12N15/52 C12P7/42 //C12R1:15
A	EP 1 006 189 A (DEGUSSA ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE)) 7. Juni 2000 (2000-06-07) * Beispiele 1-9 *	1-10	
P,X	EP 1 106 622 A (DEGUSSA) 13. Juni 2001 (2001-06-13) SEQ ID NO:1,2 * Beispiele 1-5 *	11,12	
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200112 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 2001-112218 XP0002183868 & WO 00 77172 A (AJINOMOTO CO INC). 21. Dezember 2000 (2000-12-21) SEQ ID NO:11,12	11	
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7) C12N C12P

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt

Recherchenort:	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
BERLIN	27. November 2001	ALCONADA RODRIG., A
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorie oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		

LIC | QM 1503 00 B2 (PD4C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 01 11 4629

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

27-11-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 1006192	A	07-06-2000	DE	19855313 A1	08-06-2000	
			BR	9905776 A	24-04-2001	
			CN	1256314 A	14-06-2000	
			EP	1006192 A2	07-06-2000	
			HU	9904447 A2	28-11-2000	
			JP	2000228990 A	22-08-2000	
			SK	163399 A3	11-07-2000	
			US	6184007 B1	06-02-2001	
EP 1006189	A	07-06-2000	DE	19855312 A1	08-06-2000	
			BR	9905783 A	24-04-2001	
			CN	1256313 A	14-06-2000	
			EP	1006189 A2	07-06-2000	
			HU	9904448 A2	28-11-2000	
			JP	2000166580 A	20-06-2000	
			SK	164099 A3	11-07-2000	
			US	6177264 B1	23-01-2001	
EP 1106622	A	13-06-2001	DE	10011922 A1	31-05-2001	
			AU	7174500 A	24-05-2001	
			BR	0005531 A	07-08-2001	
			CN	1297054 A	30-05-2001	
			EP	1106622 A2	13-06-2001	
			JP	2001186896 A	10-07-2001	
			PL	344073 A1	04-06-2001	
WO 0077172	A	21-12-2000	AU	5106800 A	02-01-2001	
			WO	0077172 A1	21-12-2000	

EPO FORM PC461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)